

in vitro 条件下における ESBL 産生 *Enterobacteriaceae* の生残性の評価

山形大学農学部 非会員 ○齋藤 静香
 山形大学農学部 正会員 渡部 徹
 山形大学農学部 正会員 西山 正晃

1. はじめに

薬剤耐性菌（Antimicrobial Resistance Bacteria : ARB）による感染症は、21 世紀における公衆衛生上の重要な問題として広く認識されている。ARB は、これまで臨床での発生が問題となっていたが、近年は市中や環境中りまでも拡散しており、世界中で ARB の種類とその総数は増加している²⁾。ARB の拡大に寄与している原因は、薬剤耐性遺伝子（Antimicrobial Resistance Genes : ARGs）の伝播であると考えられている。ARGs がプラスミドなどの可動遺伝子上にコードされた場合には、同一世代間で ARGs の伝播（水平伝播）によって非耐性菌の耐性化が発生するため、ARB の問題はより複雑になる³⁾。環境中での ARB の動態を把握することは重要であるが、ARB の生残性やプラスミドの宿主細胞内での保存性に関する知見はあまりない。

我々の研究グループでは、流入下水中の ESBL（Extended-Spectrum β -Lactamase : ESBL）産生菌の検出率が高く、それらは異なる 17 種類の β ラクタマーゼ産生遺伝子 (*bla*) が検出されたことを報告している⁴⁾。さらに、*bla* が複数種の *Enterobacteriaceae* から検出されており、CTX-M 型 (*bla*_{CTX-M group 1} と *bla*_{CTX-M group 9}) が広範囲に伝播していることを発見した⁴⁾。そこで本研究では、モデル細菌として ESBL 産生 *Enterobacteriaceae* を使用し、温度、振とうの有無の培養条件を変化させた in vitro 条件下における ARB の生残性とプラスミドの保存性について評価した。

2. 実験方法

2. 1 供試菌株

本研究で使用した供試菌株を表 1 に示す。*Escherichia coli* (*bla*_{CTX-M group 1}, *bla*_{CTX-M group 2}, *bla*_{CTX-M group 8})、*Enterobacter cloacae* (*bla*_{CTX-M group 9})、*Enterobacter asburiae* (*bla*_{ACT-4})、*Klebsiella quasipneumoniae* (*bla*_{CTX-M-14})、*Enterobacter hormaechei* (*bla*_{CTX-M group 1 gene}) を使用した。菌株は実験に使用するまで、-80°C で保存した。

2. 2 in vitro 培養実験

供試菌株を Luria-Bertani 寒天培地 (LB、1.5%、BD) に塗布し、37°C で 20 時間培養した。その後、形成された単一コロニーを 10 mL の LB 液体培地に接種し、4 時間振とう培養した。培養後、1 mL の培養液をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄した。洗浄後の培養液を、10 mL の PBS を基質として、振とう培養と静置培養の条件で培養した。温度条件は 37°C と 20°C で行い、最長 96 日間培養した。各培養条件下で培養後に適宜希釈した培養菌液 100 μ L を、LB 寒天培地と抗菌薬を添加した LB 寒天培地 (AMPC 10 mg/L + CTX 4 mg/L) に

表 1 本研究で使用した 8 種の ESBL 産生 *Enterobacteriaceae*

細菌種	菌種名	単離起源	β ラクタマーゼ (<i>bla</i>) 遺伝子	<i>bla</i> の局在位置
<i>Escherichia coli</i>	NCTC13353	標準株	<i>bla</i> _{CTX-M group 1}	プラスミド
<i>Escherichia coli</i>	NCTC13462	標準株	<i>bla</i> _{CTX-M group 2}	プラスミド
<i>Escherichia coli</i>	NCTC13463	標準株	<i>bla</i> _{CTX-M group 8}	プラスミド
<i>Enterobacter cloacae</i>	NCTC13464	標準株	<i>bla</i> _{CTX-M group 9}	プラスミド
<i>Enterobacter cloacae</i>	6/4H-B2	環境分離株	<i>bla</i> _{CTX-M group 9}	プラスミド
<i>Enterobacter asburiae</i>	4/4H-8	環境分離株	<i>bla</i> _{ACT-4}	染色体
<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	11/5W1-B5	環境分離株	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	プラスミド
<i>Enterobacter hormaechei</i>	10/15W1-B5	環境分離株	<i>bla</i> _{CTX-M group 1}	染色体

キーワード : ESBL 産生 *Enterobacteriaceae*、ESBL 産生遺伝子、プラスミド、in vitro 実験

連絡先 : 〒997-8555 山形県鶴岡市若葉町 1-23、Tel : 0235-28-2894、e-mail m-nishiyama@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

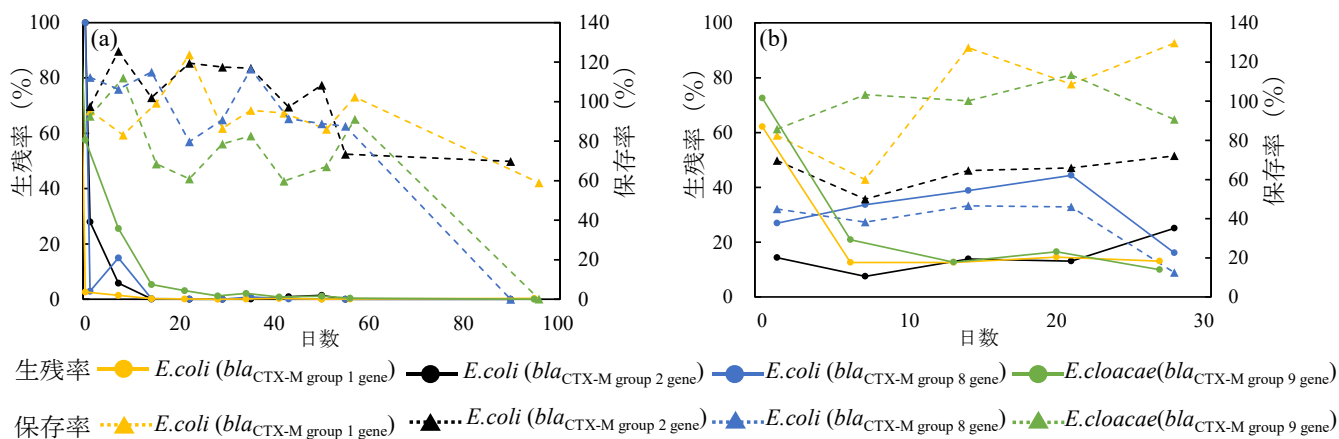


図1 37°C (a) と 20°C (b) における ESBL 産生 *Enterobacteriaceae* の生残率と保存率（振とう培養：標準株）

に塗抹した。培養後、プレート上に生育したコロニー数を計数した。細菌数の計数は、1 試行に対して 3 回分を平均し、それぞれの細菌数 (CFU/100mL) とした。培養後、抗菌薬含有培地上に生育したコロニーをランダムに単離し、対象とする *bla* が検出されるか PCR 法にて確認した。

2. 3 ARB の生残性とプラスミドの保存性の評価

ARB の生残性とプラスミドの保存性の評価は、抗菌薬添加と無添加の LB 培地上に生育したコロニー数から算出した。生残率 (%) は、各培養日数における抗菌薬添加培地上のコロニー数を、培養初期 (0 日目) の抗菌薬添加培地上のコロニー数で除して算出した。プラスミドの保存率 (%) は、各培養日数における抗菌薬培地上のコロニー数を、抗菌薬無添加の培地を使用したコロニー数で除して算出した。

3. 結果と考察

図 1 (a) に 37°C における ESBL 産生 *Enterobacteriaceae* 生残率の推移を示す。*E. coli* である NCTC13353、NCTC13462 ならびに NCTC13463 は、培養 1 日後で生残率が 30% 以下に減少した。その一方で、NCTC13464 (*E. cloacae*) の 1 週間後の生残率は 25% と他の菌株と比較して高く、菌種による生残性の違いによる影響が確認された。全菌株において 20 日以上経過すると生残率はほぼ 1% 以下になり、その後の生残率に大きな変化は見られなかった。培養温度を 20°C に低下させた場合の生残率は、いずれの菌株でも高くなり、NCTC13353 と NCTC13462 では 1 日後で 60~90% であった (図 1 (b))。また、28 日後までの 20°C における生残率は、全菌株で 37°C と比較して 5~20 倍高かった。37°C では、大腸菌の生化学的変化によって生じる熱ストレスの影響が細胞死の誘発を引き起こしたことが原因で、20°C に比べて生残率が低くなったと考えられた⁴⁾。*bla*_{CTX-M} group 1 を保有する環境株と標準株の生残率には、ほとんど違いがなかった一方で、*bla*_{CTX-M} group 9 の場合は両者に明確な差が見られた。このことから、耐性菌の生残率は MIC によって決まり、保有する ARGs の種類には依存しないと考えられた。

37°C における標準株の耐性遺伝子の保存率は 0~120% で推移し、約 1 ヶ月経過しても *bla*_{CTX-M}-group 2 を除いて 90% 程度であった。培養温度を 20°C とした場合には、*bla*_{CTX-M} group 1 を除き、いずれの菌株も静置と振とう条件では保存率が低下した (NCTC13462, NCTC13464)。したがって、同一菌株を培養した場合、培養温度が低い場合に耐性遺伝子の欠落が生じると推察された。標準株と環境株の保存率を比較すると、環境株では試験に供した 4 株いずれも 37°C の培養条件下で約 1 ヶ月経過しても 98~100% と高い割合で保有していた。

以上のことから、ESBL 産生 *Enterobacteriaceae* の生残性は菌種によって異なり、培養温度が低いほどその生残率は高くなったが、耐性遺伝子の保存率は逆に低下する傾向が得られた。

謝辞 本研究は科学研究費補助金 (21K14274) より実施した。

参考文献

1) 森ら, 土木学会論文集 G(環境), 2021. 2) Fang, et al. *Journal of Hazardous Materials*, 423, 2022. 3) Zhang, et al. *Environmental Pollution*, 237, 2018. 4) Hashimoto, et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 515, 2019.